

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-317092

(43)Date of publication of application : 26.12.1988

(51)Int.Cl.

C12P 7/66

//(C12P 7/66

C12R 1:01)

(21)Application number : 62-151059

(71)Applicant : MITSUBISHI GAS CHEM CO INC

(22)Date of filing : 19.06.1987

(72)Inventor : URAGAMI SADAJI

KOGA HIROMI

(54) PRODUCTION OF COENZYME Q10

(57)Abstract:

PURPOSE: To readily, efficiently and stably obtain a coenzyme Q10 useful in a medicine such as heart function-accentuating agent, feed additives, etc., by extracting a bacterium cell obtained by cultivating a coenzyme Q10 producing bacterium belonging to the genus Oligomonas.

CONSTITUTION: A bacteria cell is separated and selected from a soil, etc., in a culture medium containing methanol to afford Oligomonas methanolica strain exhibiting the following bacteriological and physiological properties: Shape and size of the cell: cocci or short rods, wide, 0.5W0.8 μ m, length, 0.5W1.5 μ m; Gram negative; capable of rearing and propagating in alkaline conditions; capable of reducing nitrate; capable of assimilating glucose and methanol, etc. Then the strain is aerobically cultivated in a culture medium containing about 6wt.% methanol, peptone, etc., at 20W42° C, pH7W10 and 0.5W20ppm dissolved oxygen concentration. Then a bacterium cell is separated from the culture medium and dried and the resultant dried bacterium cell is heated with ethanol, etc., at 50W90° C for about 1hr to provide an extract, which is fractionated with silica gel, etc., and purified to liberate the aimed coenzyme Q10.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

④日本国特許庁(JP)

⑤特許出願公開

⑥公開特許公報(A) 昭63-317092

⑦Int.Cl.*	識別記号	序内整理番号	⑧公開 昭和63年(1988)12月26日
C 12 P 7/66		A-7236-4B	
(C 12 P 7/66			
C 12 R 1/01)			審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑨発明の名称 補酵素Q₁₀の製造法

⑩特許 昭62-151059

⑪出願 昭62(1987)6月19日

⑫発明者 浦上 執治 新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱瓦斯化学株式会社新潟研究所内

⑬発明者 木我 浩美 新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱瓦斯化学株式会社新潟研究所内

⑭出願人 三菱瓦斯化学株式会社

⑮代理人 小畠 貞文

明細書

1. 発明の名称

補酵素Q₁₀の製造法

2. 特許請求の範囲

オリジンをテヌ酸に属する補酵素Q₁₀生産細胞を培養して菌体を得、得られた菌体から補酵素Q₁₀を分離、精製することを特徴とする補酵素Q₁₀の製造法

3. 発明の詳細な説明

(生産上の利用分野)

本発明は、補酵素Q₁₀の製造法に関し、さらに詳細には、微生物を使用した補酵素Q₁₀の製造法に係わる。

補酵素Q₁₀は、生物内の末梢呼吸系の電子伝達体として重要な役割を果たし、心臓循環亢進剤、腎臓筋無効化剤、抗血栓治療薬、再生不良性貧血治療剤および円形虫毛瘧疾原虫などの医薬品ならびに調剤添加剤などとして有効な化合物とし

て知られている。

【従来の技術】

従来、補酵素Q₁₀は、動物および植物などのそれぞれの組織から抽出され、さらに、精製することにより製造されており、品質の均一性に問題があり、また、原料の供給が不安定であった。

このような欠点を回避するための一方法として、最近では、微生物を培養して得られた菌体から補酵素Q₁₀を抽出する方法が知られている。

しかししながら、微生物の補酵素Q₁₀の生産性は、実用に供するには、まだ、充分ではなく、補酵素Q₁₀の生産の大きな微生物の発見が期待されている。

本発明は、微生物を使用し、効率よく補酵素Q₁₀を製造する方法を提供することを目的とする。

【問題を解決するための手段、作用】

本発明者は、補酵素Q₁₀を多量に生産する菌を見出すべく研究を重ねた結果、オリジンをテヌ酸に属する菌株が、その菌体内に多量の補酵素Q₁₀を多量に生産、蓄積することを見出し、本発明に

特開昭63-317092 (2)

對照した。

すなはち、木飛明は、オリゴモナス菌に属する
細菌素Q₁₁、生産細菌を培養して菌体を折、ほぐされた
菌体から細菌素Q₁₁を分離、回収することを發
明とする細菌素Q₁₁の製造法である。

木飛明用に用いられる細菌は、アルカリ性で生育、
増殖し、メタノールを唯一の炭素源として変化す
ることができる、グラム陰性で、かつ、諸細菌Q₁₁
を生産する細菌である。本細菌は、その宿主的性
質によれば、從来知られている菌、即には該当す
るもののみられず、本細菌は、新しい属に属する
細菌と判断した。

木飛明氏は、本細菌について、該菌を設立す
る必要があると考へてオリゴモナスOligomonas
と命名した。

木飛明のアルカリ性メタノール変性細菌のう
ち、代表的な菌株であるO-3(原工研菌第9280号),
O-75(原工研菌第9281号)およびO-100(原工研
菌第9282号)のそれぞれの細胞的性質を示す。
菌学的性質:

④ 顯微鏡的形態

Na₂CO₃で、pH 9.0に調整した肉汁液体培地お
よび肉汁寒天培地で30℃で3日間培養した。

① 菌胞の形態および大きさ

通常は、球菌または短桿菌、径 0.5~0.8μm,
長さ 0.5~1.5μm

② 運動性 なし。

③ 菌子の有無 生産されない。

④ グラム染色 グラム陰性

⑤ 抗酸性 酸性

⑥ 各種の培地における生育状態

① Na₂CO₃でpH 9.0に調整した肉汁平板培養
30℃で3日間培養。

中程度の生育を示す。

ヨロニーの形態: 外形は円形、大きさは 2~
3μm、辺縁は平滑状、被覆は均勻、表面は平
滑、辺縁は平滑で全縁、色は黄白色で光沢あ
り、透明度は不透明、硬度はバター質。

⑦ メタノール含有寒天平板培養

30℃で3日間培養。

①と同じ。

⑧ Na₂CO₃でpH 9.0に調整した肉汁寒天
培養

30℃で3日間培養。

振盪培養に一様に旺盛に生育する。

胞子は中程度、表面は平滑、辺縁は平滑で全
縁、色は黄白色で光沢あり、透明度は不透明、
硬度はバター質。

⑨ メタノール含有寒天斜面培養
30℃で3日間培養。

①と同じ。

⑩ Na₂CO₃でpH 9.0に調整した肉汁培養
30℃で3日間培養。

全体に生育する。沈澱あり。

⑪ Na₂CO₃でpH 9.0に調整したペプトン水
30℃で5日間培養。

全体に生育する。しかし、生育は旺盛ではない。

⑫ メタノール含有液体培地
30℃で3日間培養。

全体に生育する。沈澱あり。

⑬ Na₂CO₃でpH 9.0に調整した肉汁寒天斜面培
養

30℃で3日間培養。

小乳頭状に一様に生育する。培地表面では、
直径 2~4mm くらいの円状に生育する。

⑭ メタノール含有斜面培養

30℃で3日間培養。

小乳頭状に一様に生育する。培地表面では、
直径 2~4mm くらいの円状に生育する。

⑮ Na₂CO₃でpH 9.0に調整した肉汁ゼラチン高
温培養

20℃で10日間培養。

菌の生育はみられるが、ゼラチンは液化され
ない。

⑯ Na₂CO₃でpH 9.0に調整したリトマスマルク
30℃で4週間培養。

菌の生育はみられるが、リトマスマルクの被
覆はおこらない。

⑰ 生理学的性質

時間間隔(3-317032 (3))

- ① 硼酸塩の反応
硝酸銀を重硝酸銀に還元する。
ただし、0.3株の還元率は弱い。

② V-P テスト 隣性

③ インドールの生成 隣性

④ 硝化水素の生成 隣性

⑤ でん前の糖水分解 隣性

⑥ くえん酸の利用 (クリスチエンセンChristensen
培地) 隣性

⑦ 亜硫酸の利用
アンモニウム塩、硝酸鹽、尿素およびペプト
ンを窒素源として利用する。

⑧ 色素の生成 生成しない。

⑨ ラレアーゼ 隣性

⑩ カタラーゼ 隣性

⑪ アンモニアの生成 生成する。

⑫ 脱硫反應 隣性

⑬ オキシダーゼ 隣性

⑭ O-P テスト 隣性

⑮ 生育の範囲

八、GND·跟名曲齊步走

● 起爆剤外の爆薬層の変化

炭素鋼	0-3	0-75	0-100
SCC原	+	+	+
12A種	+	+	+
船 舶	+	+	+
モ	-	-	-
37-10 **	+	+ (W)	+
37-10B **	+	+	+
UJXFBFLZL	+	-	+
SKH51LZL *	-	-	-
SKH51LZL	-	-	-
スチ	-	-	-
ニチ	-	-	-
水 蒸	-	-	-

+ (H) : 調べ生育する
+ : 0.15 容器%
** : 0.5 容器%

- ④ 耐塩性
3重量%NaCl含有培地で弱く生育する。
 - ⑤ ピクニン要求性
ビオチンを要求する。

● 66(ダニッシュカシミン)本體

-3	63.9 mol%
-75	64.7 mol%
-180	64.4 mol%

- ④ 主要な固体培养基組成
セノ不動脂 斜面 C₁₀₀
 - ⑤ 主要なヒドロキシン酸
3-ヒドロキシ酸 C₁₀₀
3-ヒドロキシ酸 C₁₀₀
 - ⑥ キノンタイプ
エビキノン Q-10
 - ⑦ 分解能
土壤

バージィズ マニユアル オブ システマティク バクテリオロジー (Barney's Manual of Systematic Bacteriology) 第1巻 [編著者 クラウス (Krieg) およびホルト (Holt)] : ウィリアムズ アンド カリルキンズ社 (William & Wilkins), 1984) によると、これらの変種は、グラム陰性、または薄塗顕微鏡で好気性であることから、

特開昭63-317092 (4)

「*Saccharomyces* & the Gram-Negative Aerobic Rods and Cocci」に含まれるものと考えられる。このSectionには、37の菌が記載されている。本細菌をこれらの菌と比較すると、保菌または耐保存であり、運動性がなく、GC含量の点から *Paracoccus*属に近いといえる。しかしながら、本細菌は、脱苦素がない点から *Paracoccus*属についての記述を一致しない。また、*Paracoccus*属に属する菌種としては、*P. denitrificans* と *P. halodenitrificans* とが存在するが、これらの菌種とは脱苦素および生存pHの点で異なる。

従って、本発明者は、本細菌を新種に認定することとして、オリゴモナス (*Oligomonas*) 属と命名し、また、菌種としてオリゴモナス メタノリカ (*Oligomonas metanolicus*) と名づけた。

本発明において、菌種の性状を調べるために実験方法は、前記のバージィズ マエアル、産業技術研究所学友会編「細菌学実習要領」(1968) および長谷川 武治 著「微生物の分類と判定」(1975) を参考した。

供試菌としては、本細菌が質化し得る炭素源であれば性状顕示はないが、メタノールのほかにエタノールなどの各種炭素源を好適に使用し得るが、その他の炭素源へたとえば、糊精、ペプトンおよび肉エキスなどの天然物、アラビノース、キシロース、グルコース、マンノース、フラクトースおよびガラクトースなどの糖類、フルビトール、マヌシトールおよびイノシトールなどの醇アルコール、また、こはく酸などの有機酸などを使用することができる。これらのうち、工業用の醸酵菌としては、メタノールが最も好ましい。培地におけるこれらの炭素源の濃度は、炭素源の性状により適宜選択される。などえば、炭素源がメタノールの場合には、培地または培養液のメタノール濃度は 5重量% 以下が好ましく、菌の生育および培養の良好さからは 3重量% 以下が特に好ましい。

窒素源としては、たとえば、アンモニウム塩、硝酸塩などの無機窒素化合物および/または、たとえば、尿素、コーン・スピディ・リカー、カゼイン、ペプトン、酵母エキス、肉エキスなどの有

機、メタノール含有寒天平板培地、メタノール含有寒天斜面培地として次の組成の培地を用いた(実施例でも同様)。すなわち、(NH₄)₂SO₄ 3 g、KH₂PO₄ 1.4 g、Na₂HPO₄ 2.1 g、MgSO₄·7H₂O 0.2 g、CaCl₂ 2.5 g、20 mg、FeCl₃ 0.4 g、K₂HPO₄ 30 mg、NaCl 4.0 g、5mcg、ZnSO₄·7H₂O 5 mcg、CoSO₄·5H₂O 0.5 mcgおよびディフコ(Difco)社製寒天(パクトラガー Bacto-agar)15 g を純水 1L に溶射し、1kg/cd で 20 分間殺菌したのち 10重量% Na₂CO₃ 水溶液を逐漸的に加え、pHを 9.0 に調整した。また、さらにメタノール 8% を無菌的に添加して、斜面培地または斜面培地としては、前記の培地において寒天を添加しないものを用いた。

土壤からの本細菌の分離は、前記のメタノール含有培地を用いる常法で行った。

本細菌の培養に使用する培地は、本細菌が質化し得る炭素源を含有していることを望し、さらに通常の窒素源および無機物などを含有する培地ならば合成培地および天然培地のどちらでもよい。

種差原有物が用いられる。

また、無機成分としては、たとえば、カルシウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、りん酸塩、マンガン塩、鉄塩、磷酸、硫酸、セリウム塩、コバルト塩、ほう素化合物およびよう素化合物が用いられる。

さらに、アミノ酸、核酸、ビタミン、酵母エキスおよび酵母エキスなどの生育促進物質も使用される。

また、使用される細菌が、栄養要求性を示す場合には、その要求物質を存在させる必要がある。

培養条件は、温度 20~42°C、好ましくは 25~40°C、pH 7~10、好ましくは 7.5~9.5 である。このような条件下培養的に培養を行う。これらの条件をはずれて培養した場合には、本細菌の増殖は比較的悪くなるが、これらの条件をはずして培養することを妨げない。

また、培養後の培養液濃度には特に留意はないが、濃度は、0.5~20 ppm が好ましい。そのため、通気量を調節したり、振搾したり、通気が

特開昭63-317032(5)

スとして酸素もしくは酸素と空気との混合ガスを使用したり、また、培養槽内の圧力を減らすなどの手段が採用される。また、培養方式は、固分培養または液体培養のいずれである。

充氮源としてアンモニアを添加した場合には、培養期間中にアンモニアが菌体生成のために消費されて培養液のpHが低下する。この場合に、培養液のpHを所定の値に保つために、アンモニア、苛性カリおよび苛性ソーダなどのアルカリを添加するが、アンモニアを添加することが好ましい。

このようにして、細胞を培養したのち、菌体を培養液から分離する。分離には通常の濃度外離手段が採用される。すなわち、離心分離手段としては、たとえば、培養液そのものをそのまま遠心分離するとの手段、培養液中に細胞同様よりも大きい他の微生物を離過剤として加えたり、または、プレコートすることにより培養液から菌体を離過分離するとの手段、培養液に懸液の離過剤を加え而菌体を離過させて、この離過菌体を離過もしくは遠心分離により培養液から分離するとの手段。

て抽出物を得る。ついで、この抽出物から、たとえば、ハイボーラスマッパーのような多孔性合板樹脂、シリカゲルおよびアリジルなどを用いて、粗酵素Q₁₀を分別、精進する。

菌体から得られた粗酵素Q₁₀の同定、定量には、一般に、高通透性クロマトグラフィー、元素分析、離心凝集、赤外吸収スペクトル、紫外吸収スペクトル、核酸共摂スペクトルおよび蛋白質分析などの手段がそれぞれ用いられる。

実施例

実施例によって本発明をさらに具体的に説明する。なお、本発明は、実施例に限定されるものではない。

実施例1

オリゴニクス メタノリカの菌体の分離

土壌サンプル約0.5~1gを殺菌水10mlに無菌的に入れ、この懸濁液1mlをメタノール含有率天平地盤地上に播種がほぼ一様になるように入れ、水分をこの率天平地に吸収させたのち、28℃で約7日間静置培養を行なった。この率天平地盤上に生

長菌液のpHを5以下にすることにより、または、pHを5以下にしさらく50~100℃で加熱することにより菌体を脱殻させて、この脱殻菌体を離過もしくは遠心分離により培養液から分離するとの手段などを適用し得る。

分離された生の菌体、または、たとえば、脱殻液などによる乾燥菌体から酵素Q₁₀を抽出し、この酵素Q₁₀は必要に応じてさらに精製に付される。

酵素Q₁₀の分離、抽出および精製は、酵素Q₁₀に適用されている通常の分離抽出法および精製法によって行なうことができる。すなわち、たとえば、エクノール、メタノールもしくはアセトシンに菌体を懸濁させて、50~90℃で1時間加熱して油出して油液を得る。または、まず、メタノール、水酸化ナトリウムおよびビロガロールの混合物を用いて、菌体中のりん酸等などのけん化性物質をけん化してけん化液を得る。これらの抽出液もしくはけん化液から、たとえば、ヒーリヤシ油のような有機溶媒によって酵素Q₁₀を抽出し

痕したコロニーの一部分をさらにメタノール含有率天平地盤で培養して得られた單一コロニーを、メタノール含有率天平地盤に懸濁して培養して、オリゴニクス メタノリカ 0-3、同 0-15 および同 0-100 のそれぞれを得た。

酵素Q₁₀の製造

純水1.8あたり、(NH₄)₂SO₄ 3 g, KH₂PO₄ 1.6 g, Na₂EDTA 2.1 g, NaSO₄ 7NaOH 0.2 g, CaCl₂ 20.0 mg, FeCl₃ 0.2 g, NH₄O 30 mg, NaCl₄ 4MgO 5mg, ZnSO₄ 7NaOH 5 mg, CuSO₄ 5H₂O 0.5mg, Na₂CO₃ 2.5 g, ビオチン 2 mgおよびメタノール 8 mlを溶解し、pH 9.0に調整した培地（以下 培地A と記す）30 mlを100ml容三重フラスコに分注し、120℃で20分間殺菌した。寒天20 gを添加したメタノール含有率天平地 (Na₂CO₃を含まない培地を120℃で20分間殺菌し、これに別に殺菌した10重量% Na₂CO₃水溶液を培地10mlあたり0.25ml添加して溶解した)で30℃、3日間培養したオリゴニクス メタノリカ 0-100 (株)研磨器(No.9282号)の1白金耳を100ml容三重フラスコ中の培地中に

特許明G3-317092 (6)

振盪し、20℃でロータリー・シェーカーで貯蔵液220回／分の振盪恒温培養を行なった。この培養液を種母液とした。

工業用水1 Lあたり、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g, Na_2SO_4 1.5 g, KH_2PO_4 4.5 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{KH}_2\text{PO}_4$ 30 mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 90 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 15 mg, $\text{MgCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 15 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.5 mg, $(\text{MnO}_2)_2 \cdot \text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mg, $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 1.0 mg, NaCl 50 mg, Fe 1.0 mgおよびビオチン10 mgを含む培地（培地B）15 Lを30 ℃で密閉槽に入れ、発酵後、アンモニア水でpH 9.0に調整し、メタノール40 mLおよび種母液200 mLをそれぞれ添加した。細菌が増殖するに従って、培養液中のメタノール濃度が低下すると、このメタノール濃度をガスクロマトグラフィーで分析し、培養液中のメタノール濃度が 0.1~0.2 %V/V になるようメタノールを補給した。温度30℃、培養液のpH 9.0、搅拌棒の轉軸数(搅拌羽根の半径71mm) 300 回／分および通気量 1vvm で造氣(空気を使用) 搅拌培養を行なったところ、世代時間

が約 4時間で初期が発現した。培養を開始してから、48時間後に、培養液を追分離し、得られた菌体を乾燥炉場して乾燥菌体 30 gを得た。

この乾燥菌体から被膜素 Q₁₀を、イソアプロパノール濃度が90重量%のイソアプロパノール水溶液で抽出し、ついで、ヘキサン絶液を行ない、得られたヘキサン溶液中の蛋白質被膜素 Q₁₀を崩壊液で純化した後、このヘキサン溶液について、高速液体クロマトグラフィーで被膜素 Q₁₀を同定し、その含量を測定した。その結果から、乾燥菌体 1 Lあたり 1.60 mgの被膜素 Q₁₀が得られたことになる。

【発明の効果】

本発明によれば、工業生産により安定して容易に入手し得る物質をも原料として使用することができ、さらに、細菌を使用して、被膜素 Q₁₀を容易に、効率よく、しかも、安定して製造することが可能となる。

また、特に、本発明における細菌は、好アルカリ性細胞なので培养における酸度による汚染が著

しく懸念される。

特許出願人 三井瓦斯化学株式会社
代表者 長野 和吉
代理人 弁理士 小国 貴文